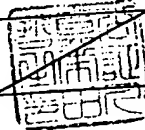


登簿平成 8 年第 1157号

嘱託人 浜野 孝雄 は本公証人の面前で別紙 翻訳

証明書 に 署名 した。

以上認証する。



平成 8 年 7 月 19 日 本職役場において

東京都千代田区内幸町2丁目1番1号

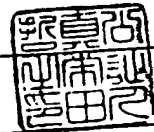
霞ヶ関公証役場

東京法務局所属

公証人

真栄田

哲



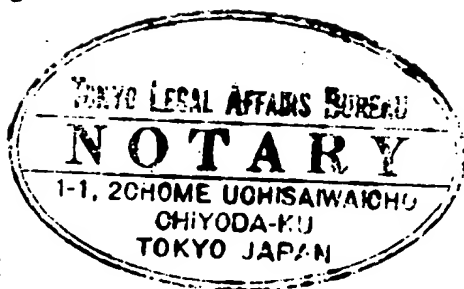
I, undersigned, Takao HAMANO, Patent Attorney,
of Bussan Building Bekkan, No. 1-15, Nishi-Shimbashi
1-Chome, Minato-ku, Tokyo, Japan, well understand both
the Japanese and English languages, and the attached
English language specification is a full, true and
faithful translation made by me of the Jananese language
specification of Japanese Patent Kokai (Pre-Examination
Publication) No. 80-162993 (Application No. 79-72085)
entitled "A PROCESS FOR PREPARING CLAVULANIC ACID" in
the name of SANRAKU-OCEAN CO., LTD.

This 19th day of July, 1996

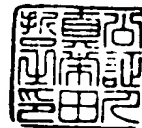

Takao HAMANO

This document was subscribed before me
by the above-named person(s) on this day

JUL 19 1996




TETSU MAEDA
NOTARY
NO. 1-1, 2-CHOME UCHISAIWACHO
CHIYODAKU TOKYO JAPAN



PRE-PUBLISHED PATENT GAZETTE

Pre-Publn. (Kokai) No. 80-162993
Pre-published Date: December 18, 1980
Examination: Requested
Int. Cl. No. C12P 17/18
(C12P 17/18
C12R 1/465)
Title: A process for preparing
clavulanic acid
Application No. 79-72085
Filing Date: June 7, 1979
Inventors: Kazuhiko Okamura
2502-1, Fujisawa, Fujisawa City
et al.
Applicant: Sanraku-Ocean Co., Ltd.
1-15-1, Kyobashi, Chuo-ku, Tokyo
Patent Attorneys: Takeshi Yano, et al.

.....
Specification

1. Title of Invention:

A process for preparing clavulanic acid

2. Claim:

1. A process for preparing clavulanic acid, characterized in that the process comprises aerobically cultivating a new strain, P6621 (Deposit No. FERM-P 2804 in Fermentation Research Institute) which belongs to the genus *Streptomyces*, and thereby accumulating clavulanic acid in the culture obtained.

3. Detailed description of the invention

The present invention relates to a process for preparing clavulanic acid using a new strain P6621 which belongs to the genus *Streptomyces*.

Clavulanic acid is a substance isolated from a culture broth of *Streptomyces clavuligerus* (Japanese Patent Publication No. 77-1996 and A.G. Brown, et al: Journal of Antibiotics, vol. 29, pp. 668, 1976). It has a relatively weak antibacterial activity against gram positive and negative bacteria, but has a strong β -lactamase inhibiting activity, and this compound is noteworthy as β -lactamase inhibitor. The β -lactamase inhibiting activity can be used together with penicillins and cephalosporins, to increase the antimicrobial activity of these β -lactam antibiotics against resistant strains capable of producing β -lactamase. Clavulanic acid has a new skeleton, and thus it is a useful substance valuable as a raw material for synthesizing semisynthetic β -lactam antibiotics which have said skeleton.

Clavulanic acid-producing strains known hitherto include *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, ATCC 27064, FERM-P No. 3007 (Japanese Patent Publication No. 77-1996), *Streptomyces jumonjinensis* No. 3008 strain, FERM-P No. 1545, NRRL 5741 (Japanese Patent KOKAI No. 77-47991), and *Streptomyces katsurahamanus* FERM-P No. 3944, IFO 13719 (translator's note: correctly 13716) (Japanese Patent KOKAI No. 78-104796).

The clavulanic acid-producing strain used in the process of the present invention is a new ray fungus of Actinomycetes. Its typical strain was isolated onto a yeast-malt agar medium from a soil sample of Saitama Suijo Park, Ageo City, Saitama Prefecture in April, 1974, and was named as strain No. P6621. Since its culture broth contains 7-(5-amino-5-carboxylvaleramido)-3-carbamoyloxymethyl-7-methoxy-3-cephem-4-carboxylic acid accumulated, a process for preparing said acid using said strain was already proposed (Japanese Patent KOKAI No. 76-110097).

Later, the present inventors have found that the strain P6621 produces a substance which has antimicrobial activity but is different from 7-(5-amino-5-carboxylvaleramido)-3-carbamoyloxy-methyl-7-methoxy-3-cephem-4-carboxylic acid in the culture broth, and they designated this substance as P6621 Factor-3. This substance was isolated, examined and identified as a known substance "clavulanic acid" as described later. Thus the present invention has been completed.

The P6621 strain which belongs to the genus Streptomyces and is used in the present process has the following microbiological characteristics.

1) Morphological properties

When the P6621 strain is grown on a yeast-malt agar culture medium at 28°C for 10 to 20 days is observed, aerial hyphae are simply branched and extend well, and their tips

are straight or slightly curved. Neither whirls nor sporangia are formed, and sclerotia are not observed. Spores are little observed but rarely formed, and the surface is smooth.

2) Properties on culture-media

The properties of P6621 strain on the following various media were observed after incubating the P6621 strain at 28°C for 14 days, unless otherwise stated.

(1) Sucrose nitrate agar medium

Obverse: White
Reverse: White
Soluble pigment: Not produced.
Growth: Medium to slightly-weak

(2) Glucose-asparagine agar medium

Obverse: Little aerial hyphae are formed, and the surface is grayish.
Reverse: White, but partially is light yellowish green
Soluble pigment: Not produced
Growth: Good

(3) Glycerol-asparagine agar medium

Obverse: White, powdery, and aerial hyphae are slightly formed.
Reverse: Light yellow
Soluble pigment: Not produced.
Growth: Good

- (4) Starch agar medium
- Obverse: White to grayish white
- Reverse: Light yellow
- Soluble pigment: Not produced.
- Starch decomposing ability: Decomposable
- Growth: Good
- (5) Tyrosine agar medium
- Obverse: White
- Reverse: Light yellow to light brownish yellow
- Soluble pigment: Not produced. Melanoid pigment
is not produced.
- Growth: Good
- (6) Nutrient agar medium
- Obverse: Aerial hyphae not formed.
- Reverse: Light yellow
- Soluble pigment: Not produced.
- Growth: Good
- (7) Yeast malt agar medium
- Obverse: White and velvety
- Reverse: Bright yellow
- Soluble pigment: Not produced.
- Growth: Good
- (8) Oat meal agar medium
- Obverse: White
- Reverse: Light yellow to bright yellow

Soluble pigment: Not produced.

Growth: Good

3) Physiologic properties

(1) Optimum temperature for growth

Optimum at 20 to 30°C. No growth at 10°C or 37°C.

(2) Optimum pH for growth

Grows at pH 5.0 to 8.0. Optimum pH at 5.5 to 7.0

(3) Liquefaction of gelatin (on glucose-peptone-gelatin medium at 20°C)

No liquefaction

(4) Hydrolysis of starch (on starch agar medium)

Hydrolyzed.

(5) Coagulation and peptonization of skimmed milk (on skim milk medium)

Peptonized.

(6) Production of melanoid pigment (on tyrosin agar medium, peptone-yeast-iron agar medium, and trypton-yeast extract liquid medium)

Not produced in any medium.

4) Assimilability of carbon sources (Pridham Gottlieb agar medium)

- | | |
|-----------------|---|
| (1) L-arabinose | - |
| (2) D-xylose | - |
| (3) D-glucose | + |
| (4) D-fructose | - |

- | | | |
|-----|------------|---|
| (5) | Sucrose | - |
| (6) | i-inositol | + |
| (7) | L-rhamnose | - |
| (8) | Raffinose | - |
| (9) | D-mannitol | - |

To summarize the above, the strain P6621 is a simply-branched strain belonging to the genus *Streptomyces*, and it usually develops straight aerial hyphae. According to the method of the International *Streptomyces* Project (ISP), judging from the colors of colonies on various media, this strain belongs to white series, and judging from the structure of the tips of aerial hyphae, it belongs to the RF (*Rectus flexibilis*) section. The strain rarely develops spores with smooth surface, and usually, spores are scarcely formed. It does not produce any melanoid pigment, and it assimilates D-glucose and i-inositol as carbon sources.

Among known Actinomycetes fungi, several strains which belong to white series and the RF section are known, and they are smooth on the spore surface and do not produce any melanoid pigment, but they are clearly different from the strain P6621 in the assimilability of carbon sources and other features.

The strain P6621 produces 7-(5-amino-carboxyvaleramido)-3-carbamoyloxymethyl-7-methoxy-3-cephem-4-carboxylic acid which is a β -lactam antibiotic. Hitherto, the following twelve

ray fungi are known as strains which can produce said acid or similar β -lactam antibiotic, but they are different from the strain P6621 in microbiological properties: Streptomyces chartreusis, S. cinnamonensis, S. fimbriatus, S. griseus, S. halstedii, S. lactamdurans, S. rochei, S. viridochromogenes, S. lipmanii, S. clavuligerus, S. wadayamensis and S. jumonjinensis. Of the twelve strains, eight strains stated in the Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition, are compared with the strain P6621 in the following.

Both S. chartreusis (International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 18, p 95, 1968) and S. viridochromogenes (ibid., vol. 22, p. 369, 1972) belong to the B (blue) series and to the S (Spira) section, and are different from the strain P6621. Both S. fimbriatus (Waxman, "The Actinomycetes", vol. 2, p. 208, 1961) and S. rochei (International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 18, p. 368, 1968) belong to the GY (gray) series and to the S (Spira) section, and are different from the strain P6621. S. cinnamonensis (Waxman, "The Actinomycetes" vol. 2, p. 195, 1961) belongs to the R (Red) series and to the S (Spira) section, and different from P6621. S. griseus (International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 18, p. 332, 1968), S. lipmanii (ibid., vol. 18, p. 140, 1968) and S. halstedii (ibid., vol. 18, p. 128, 1968) belong to RF (Rectus flexibilis) section. The former two belong to Y (yellow) series, and the latter one belongs to the GY (gray) series. Therefore, they are

different from the strain P6621.

The remaining four strains are compared below with the strain P6621. It is known that all these four strains produce 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-3-carbamoyloxymethyl-7-methoxy-3-cephem-4-carboxylic acid.

S. lactamdurans (Japanese Patent KOKAI No. 71-3286) is powdery and creamy in the color of aerial hyphae on various media, and it liquefies gelatin, unlike the strain P6621. Moreover, as regards the ability to utilize carbon sources, it uses L-arabinose, D-xylose, raffinose and D-mannitol, but does not use i-inositol and is quite different from the P6621. S. wadayamensis (Japanese Patent KOKAI No. 74-30593) is considered to belong to the S (Spira) section and is noticed to belong to the GY (gray) series through observation on an oat meal agar medium, a yeast malt agar medium, etc. It also forms a melanoid pigment. Therefore, it is noted to be different from the strain P6621. S. jumonjinensis (Japanese Patent KOKAI No. 74-42893) is also considered to belong to the S (Spira) section, and it is white to brownish gray in the color of aerial hyphae on a yeast malt agar medium. It also forms a soluble pigment and is different from the strain P6621 in regard to the carbon source-usability for many saccharides. Therefore, it is considered to be quite different from the strain P6621. As S. clavuligerus (C.E. Higgins & R.E. Kastner, International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 21,

P.326, 1971) is considered to be most closely related to the strain P6621, S. clavuligerus NRRL 2585 was used for tests for comparison with the strain P6621.

Properties found to be different between both these two strains are described below.

Difference in morphological properties

S. clavuligerus has one to four spore chains at the tip of each aerial hypha, and the head has such a special structure as to be roundly swollen to be branched, but the strain P6621 does not show such a structure, and aerial hyphae have simply straight tips.

Difference in properties on media

The difference between both these strains is shown in the following table.

Culture Medium	<u>S. clavuligerus</u>	Strain P6621
Sucrose nitrate agar medium	Growth: Poor Aerial hyphae: Not formed Reverse: Dark	Growth: Poor to medium Aerial hyphae: White Reverse: White
Starch agar medium	Aerial hyphae: Gray (2fe) to bright olive gray Reverse: Light yellow	Aerial hyphae: White(b) to grayish white Reverse: Dimmer light yellow than S. clavuligerus
Yeast malt agar medium	Aerial hyphae: Bright grayish olive color (1-1/2 ge) to bright brownish gray (3fe) Reverse: Grayish yellow to bright yellow	Aerial hyphae: White (b) Reverse: Light yellow to bright yellow

Assimilability of carbon sources

Saccharaide	<u>S. clavuligerus</u>	P6621 strain
D-glucose	-	+
i-inositol	(+)	+

As stated above, on a yeast malt agar medium and a starch agar medium, S. clavuligerus has spores adhering abundantly and produces grayish green aerial hyphae, while the P6621 has spores adhering poorly and produces white aerial hyphae. Furthermore, they are different in the ability to utilize D-glucose and in the morphological feature at the tips of aerial hyphae.

Based on the above findings, the strain P6621 does not coincide with any known strain, and it should be recognized as a new strain belonging to the genus *Streptomyces*.

The *Streptomyces* strain P6621 has been deposited in Fermentation Research Institute, the Agency of Industrial Science and Technology, as deposit No. FERM-P 2804.

S. katsurahamanus strain (Japanese Patent KOKAI No. 78-104796) capable of producing clavulanic acid, which was reported later than the strain P6621, is also a strain considered to belong to the S (Spira) section, and is grayish blue in the color of aerial hyphae on a yeast malt agar medium. It forms a soluble pigment and can not utilize D-glucose or i-inositol, and it is positive in gelatin liquefaction. Therefore, it is considered to be quite different from the P6621. Since it is generally well known that mutation of actinomycetes occurs frequently, the new strain P6621 belonging to the genus *Streptomyces* in the present invention includes all the spontaneous and artificial mutants. Namely, it includes all the strains which produce clavulanic acid and which can not be clearly distinguished from the strain P6621.

The cultivation of the strain P6621 in the present process is carried out according to a usually used conventional cultivation method for producing antibiotics from Actinomycetes fungi. Namely, shake-cultivation or submerged

aerated-cultivation is preferable. As for the medium ingredients, dextrose, glycerol, sucrose, soluble starch, lard, soybean oil, dextrin, molasses, etc. may be added as carbon sources. As nitrogen sources, meat extract, peptone, Casamino acid, corn steep liquor, soybean meal, cotton seed meal, casein, dry yeast, peanut meal, ammonium sulfate, sodium nitrate, potassium nitrate, etc. may be added as inorganic salts, potassium dihydrogenphosphate, dipotassium hydrogenphosphate, calcium carbonate, magnesium sulfate, iron sulfate, sodium chloride, potassium chloride, etc. may be added. As required, methionine, a trace amount of heavy metals, vitamins, antifoamer, etc. may be added. The incubation is carried out at 18 to 30°C. The amount of the active ingredient in the culture broth in the progress of cultivation is determined by the disc test method using the Comamonas terrigena B-996 as the test microbe. Usually, the amount of the active ingredient reaches the maximum in 40 to 75 hours.

Clavulanic acid as produced and accumulated mainly in the liquid portion of the culture broth can be recovered and purified by conventional adsorption and elution methods.

For instance, the recovery may be carried out by optionally combining the adsorption on active carbon or activated granular active-carbon or a porous aromatic polymer having amine groups and phenolic hydroxyl group at the

surface (trade name: HS-resin available from Hokuetsu Carbon Industrial Co.), with the elution by an aqueous solvent such as methanol, ethanol, water or aqueous acetone, or with adsorption-elution by an anion exchange resin such as Dowex 1x2 (made by Dow Chemical), porous crosslinked polystyrene strong anion exchange resin (trade name: Diaion PA306 made by Mitsubishi Chemical Industries, Ltd.), crosslinked dextran strong anion exchange resin (trade name: QAE Cephadex A25 made by Pharmacia), etc., or gel filtration by crosslinked dextran (trade name: Cephadex G-10 made by Pharmacia), Bio-Gel P-2 (made by Biorad), or chromatography on the column method or the thin layer method using DEAE (diethylaminoethyl)-cellulose, DEAE-crosslinked dextran matrix (trade name: Cephadex made by Pharmacia), crystallized cellulose (trade name: Avicel made by Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), or by repeatedly using these methods.

The active ingredient, P6621 Factor 3 as accumulated in the culture broth of the strain P6621 gives $R_f = 0.30$ in the descending paper chromatography developed with a developing solvent (eluent) comprising 120 ml of acetonitrile, 30 ml of 0.1M Tris hydrochloric acid buffer solution (pH 7.5), and 1 ml of 0.1M EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid). Because P6621 Factor 3 shows antibacterial activity against the Comamonas terrigena B-996, it can be detected by bioautography using it. P6621 Factor 3 gives a single

active-spot by performing co-chromatography with an authentic clavulanic acid.

The P6621 Factor 3 (sodium salt) isolated by the above method gives the following physicochemical properties.

Ultraviolet absorption spectrum: Does not give any special ultraviolet absorption at 220nm or more in methanol.

Infrared absorption spectrum: The infrared absorption spectrum of P6621 Factor 3 (sodium salt) measured by the KBr pellet method shows the following characteristic maximum absorption wave numbers, as shown in Fig. 1.

Approx. 1790 cm^{-1} (β -lactam ring $-\text{CO}-$)

Approx. 1700 cm^{-1} ($-\text{C}=\text{C}-\text{O}-$)

This infrared absorption spectrum perfectly coincides with that of authentic clavulanic acid (sodium salt).

P6621 Factor 3 (sodium salt) gives a minimum inhibitory concentration (MIC) of about $31\text{ }\mu\text{g/ml}$ against Staphylococcus aureus Russel strain, when measured by a dilution method on agar.

These properties perfectly coincided with those of an authentic clavulanic acid (sodium salt), and it was confirmed that the active ingredient P6621 Factor 3 is clavulanic acid.

Example for the present invention is described below. The essential part of the present invention resides in a method of aerobically cultivating the new actinomycetes strain P6621, to accumulate clavulanic acid in the culture. The Example is merely illustrative, and the present

invention is not limited thereto. In the Example, % means g/dl %, unless otherwise specified.

Example 1

Actinomycetes, Streptomyces sp. P6621 strain, which has well grown on the ISP-2 slant agar medium, was inoculated at one platinum loopful amount into a 250 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of the following seed culture medium SE-4, and shake-cultivation was carried out at 28°C for 48 hours, on a rotary shaker.

SE-4 Medium:

Meat extract	(made by Difco)	0.3%
Trypton	(made by Difco)	0.5
Glucose		0.1
Soluble starch		2.4
Yeast extract		0.5
Calcium carbonate		0.4
Defatted soybean meal (Essan M)		0.5

pH 7.5 (adjusted by sodium hydroxide before sterilization)

The cultured broth was inoculated in 1 ml-portions into each of sixty 500 ml capacity-Erlenmeyer flasks sterilized under pressure and containing 100 ml of the following production medium, and shake cultivation was carried out at 28°C for 48 hours, on a rotary shaker.

Production medium:

Soluble starch	2.0%
----------------	------

Glycerol	0.3
Defatted soybean meal	1.0
Corn steep liquor	0.1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01

pH 7.0 (adjusted by sodium hydroxide before sterilization)

The cultured broth was collected, and the cellmass was separated by centrifugation. The supernatant solution (5 l) was obtained. It was fed through a column packed with 200 ml of crosslinked polystyrene strong anion exchange resin "Diaion PA 306" (Cl⁻-form) (available from Mitsubishi Chemical Industries, Ltd.), to adsorb the active substance. The column was washed with 400 ml of distilled water, and subjected to an elution using an aqueous sodium chloride solution with a linear concentration gradient of 0 to 1 M. The eluate was collected in 20 ml-fractions. Active fractions Nos. 18 to 29 (the activity was measured by bioassay with Comamonas terrigena B-996 as the test microbe) were collected, and passed through a column packed with 100 ml of porous aromatic polymer, "HS-resin" (available from Hokuetsu Carbon KK) having amine groups and phenolic hydroxyl groups at the surface, for the adsorption. The column was washed with 100 ml of distilled water, and subjected to an elution using aqueous acetone with a linear concentration gradient of 0 to 30%. The eluate was collected in 10 ml-fractions. The respective fractions were subjected to a descending paper chromatography using a following developing-solvent, and fractions Nos. 5 to

12 rich in the active substance and showing $R_f = 0.30$ were collected.

Developing solvent for paper chromatography:

Acetonitrile	120 ml
0.1M Tris hydrochloric acid buffer solution (pH 7.5)	30 ml
0.1M EDTA (pH 7.5)	1 ml

Fraction Nos. 5 to 12 were fed through a column packed with 20 ml of crosslinked dextran-matrix strong anion exchange resin, "QAE Cephadex A-25" (a product of Pharmacia), for the adsorption. The column was washed with 20 ml of distilled water, and subjected to an elution using NaCl solution with a linear concentration gradient of 0 to 1 M. The eluate was collected in 20 ml-fractions. Active fractions Nos. 18 to 23 were collected and adjusted to pH 2.5 by aqueous hydrochloric acid solution, followed by extraction with an equal amount of n-butanol added. The upper n-butanol layer was taken, and was added with a 0.01 M phosphoric acid buffer solution (pH 7.0) at a volume of 20% based on the amount of the upper layer taken, for the extraction. During extraction, pH was examined, and the solution was adjusted to 7.0 with sodium hydroxide. The aqueous layer was taken, and subjected to gel-filtration on the crosslinked dextran-matrix "Cephadex G-10" (a product of Pharmacia). The column was developed using distilled water. Active fractions were collected and freeze-dried. A sample of the freeze-dried material was

dissolved into a small volume of deionized water, and the resulting solution was fed through a column packed with 200 ml of chromatographic cellulose (Whatman CC31), for adsorption. The column was developed with the upper layer of n-butanol : ethanol : water (4 : 1 : 5) as the eluting solvent. The active fractions were collected and dried under reduced pressure on a rotary evaporator. The residue was dissolved into a small amount of distilled water and freeze-dried, to obtain 18 mg of sodium clavulanate.

Brief description of Drawings

Fig. 1 shows an infrared absorption spectrum of sodium clavulanate obtained from the culture of *Streptomyces* SP. P6621 strain, when measured by the KBr tablet method.

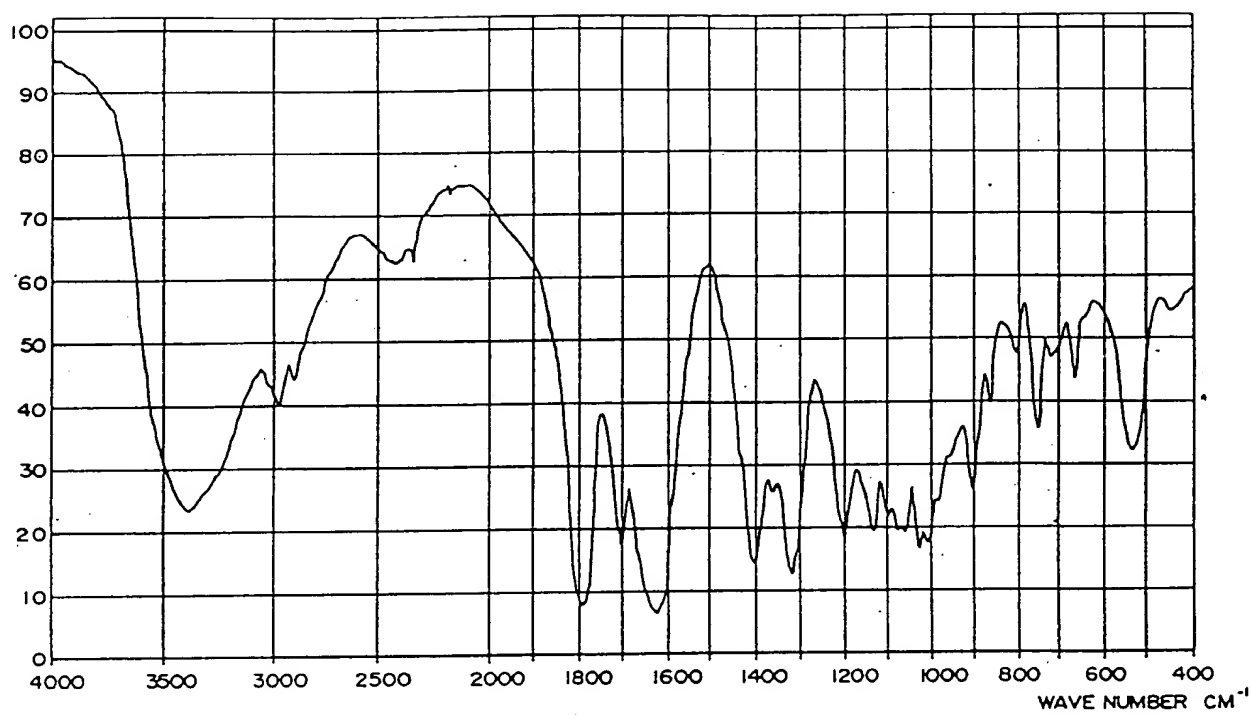
Applicant: Sanraku-Ocean Company Ltd.

Agents: Takeshi Yano, and two others

FIG. 1

特開昭55-162993(8)

系 1 図



⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—162993

⑮ Int. Cl.³
C 12 P 17/18
// (C 12 P 17/18
C 12 R 1/465)

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和55年(1980)12月18日

7115—4 B

6760—4 B

発明の数 1
審査請求 有

(全 8 頁)

⑭ クラバラン酸の製造法

⑯ 特 願 昭54—72085
⑰ 出 願 昭54(1979)6月7日
⑱ 発 明 者 岡村和彦
藤沢市藤沢2502—1
⑲ 発 明 者 石倉知之

茅ヶ崎市小和田640番地
⑲ 発 明 者 河野景明
東京都大田区池上7—16—3
⑲ 出 願 人 三楽オーシャン株式会社
東京都中央区京橋1丁目15番1号
⑲ 代 理 人 弁理士 矢野武 外2名

明 細 書

1. 発明の名称 クラバラン酸の製造法

2. 特許請求の範囲

1. ストレプトミセス属に属する菌類、P4421 菌株 (改工研菌第 2804 号) を好気的に培養し、その培養液中にクラバラン酸を蓄積させることを特徴とするクラバラン酸の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、ストレプトミセス属に属する菌類、P4421 菌株によるクラバラン酸 (Clavulanic acid) の製造法に関するものである。

クラバラン酸は、コールらによってストレプトミセス・クラブリゲルス (*Streptomyces clavuligerus*) の培養物から単離された物質 (特公昭 52—14 1994 号及びユー・シー・ブラウンら: ジョーナル・オブ・アンチバイオティクス (A.O. Brown: Journal of Antibiotics) 第 29 巻、448 頁、1976 年に記載) であって、そのグラム陽性及び

落性菌に対する抗菌活性は比較的強いが、そのノラクトマーゼ阻害活性は強く、ノラクトマーゼ阻害物質として注目される化合物である。そのノラクトマーゼ阻害活性を利用して、ペニシリンやセファロスポリン類と併用することにより、ノラクトマーゼ産生菌の耐性菌に対するこれらのノラクトム抗菌物質の製造法を増大させることが出来る。また、本物質は新規な骨格を有し、その骨格を有する化合物ノラクトム抗菌物質の合成原料としての価値を有する有用物質である。

現在までの所、クラバラン酸生産菌としては、ストレプトミセス・クラブリゲルス (*S. clavuligerus*) NRRL 3583, ATCC 27064, PERM-P 43007 (特公昭 52—14 1994 号)、及びストレプトミセス・ジュモシネンシス (*S. Jundschinnensis*) 63008 株、PERM-P 4345, NRRL 3741, (特公昭 52—14 1994 号) 及びストレプトミセス・カンパハマス (*S. Katsurabamasa*) PERM-P

本材料の万能で実用をたもて置かれた、改定版の
版である。その代役係に、1974年4月に三

その後、不明者らは、この関係がその性質上
中K、 γ -（3-アミノ-3-カルボキシルバレ
ルアミド-3-カルボキイロキシメチル- γ -ノ
トキシ-3-セフェム-4-カルボン酸）と見出た
ら既知の化合物を生成することを見出し、この
物質を34621-ファクタ-3と付名し、これを平

女 面：白色
 其 面：白色
 阿蘇尼比基：三股牛仔

四：又甲國水、殆んど形以せり、故に
以てを待ひし。

出：白色、一部は黄らみ灰色となす
可溶性塩：無
試：足計

图：蓝色、白色、灰甲被染成黑色。

又用以下各。

圖：阿美色
可路德色：伍成丁
圖：吳林

本館の万端で用いたストリプトイムス製
紙のP421 巻紙に以下のホリ抜の図案の複製を
載している。

イースト、炭素を大層以上凡 25°C で 10 ~ 20 日
三度まで元菌を栽培すると、大甲虫の体内から
してよく伸び、その先方に短く又に直ぐに折
れている。第三子及び第四子の形は直ぐに折
れ、認められず、第五子の形は直ぐに折れ、認め
られず、これに形は直ぐに折れ、その後面に子で

下は冬型で、上での型は、升付と云ふらしい。

改 面：日色一灰白色
 改 面：海灰色
 可 能 三 色 系：三 以 七 丁
 改 面 分 隔 刀：分 隔 丁 白

我 國：白色
 英 國：海藍色—海軍藍色
 町 道：藍色系*：藍灰、丁、ノラニ
 紅、白、

我 國：以中國為形政之丁
 我 國：以中國為形政之丁
 我 國：以中國為形政之丁
 我 國：以中國為形政之丁

B. caetereus (インターナシ. ナル. ジ. ナル. オブ. システムマテ. ック. バクテリアロジー - *International J. System Bacteriol.* 18 巻 93 頁 1968 年) 及び B. viridochromogenes (同誌 22 巻 367 頁, 1972 年) は共に B (青色) シリーズに属し, B (*Spira*) セクション. ンに属する菌体であり P4421 菌体とは異なる. B. fibriatus (ワグスマン著「ジ. アグナノミセナス」2 巻, 208 頁, 1961 年) 及び B. rochei (インターナシ. ナル. ジ. ナル. オブ. システムマテ. ック. バクテリアロジー, 18 巻, 368 頁, 1968 年) は共に OY (灰色) シリーズに属し, B (*Spira*) セクション. ンに属する菌体であり, P4421 菌体とは異なる. B. cinabazonensis (ワグスマン著「ジ. アグナノミセナス」2 巻, 195 頁, 1961 年) は R (赤色) シリーズに属し B (*Spira*) セクション. ンに属し, P4421 菌体とは異なる. B. griseus (インターナシ. ナル. ジ. ナル. オブ. システムマテ. ック

. バクテリアロジー, 18 巻, 332 頁, 1968 年). B. liposacili (同誌 18 巻, 140 頁, 1968 年) 及び B. haleoedili (同誌 18 巻, 123 頁, 1968 年) は共に RY (*Rectus Flexibilis*) セクション. ンに属する菌体であるが前者は Y (灰色) シリーズに属し, 後者は RY に属する菌体であって P4421 菌体とは異なるのである.

次に, 残りの 4 株について P4421 菌体と比較する. これら 4 菌体はどれも 7-(5-アミノ-5-カルボキシペンタミド)-3-カルバモイコキシメタル-7-メトキシ-3-セフェム-4-カルボン酸を生成することが知られている.

まず, B. lactandurans (日本公開特許公報, 特開昭 46-3284) は各培養基に与えるスリム菌糸の色が粉茶状, クリーム色であって, セラチンを消化する点 P4421 菌体とは異なるが, 炭水化物の利用性においても, L-アラビノース, D-キシロース, ラフィノース, D-マンニットを利用

し, L-イノシトールを利用しないなど P4421 菌体とは全く異なる菌体である. B. wadayanensis (日本公開特許公報, 特開昭 49-30593) は B (*Spira*) セクション. ンに属する菌体と考えられ, オートミール寒天培地及びイースト寒天培地培地での菌糸より OY (灰色) シリーズに属する菌体と考えられ, ノラニン染色液も形成するので, P4421 菌体とは異なるものと考えられる.

B. Junonjiaensis (日本公開特許公報, 特開昭 49-42893) も B (*Spira*) セクション. ンに属すると考えられる菌体であり, イースト寒天培地培地のスリム菌糸の色が白〜茶灰色で, 可溶性色素を生成する点, 並びに炭水化物利用性が多くの点で異なる点等から P4421 菌体とは全く別の菌体と考えられる. 最近に, P4421 菌体と最も近似していると考えられる B. clavuligerus (O. E. Higgins & R. E. Keetoer インターナシ. ナル. ジ. ナル. オブ. システムマテ. ック. バクテリアロジー 21 巻,

326 頁, 1971 年) については B. clavuligerus NRRL 2585 を用いて, P4421 菌体との比較試験を実施した.

次にこの両者間において菌糸の認められる三次について検討する.

形態的三次上の差異

B. clavuligerus はスリム菌糸の先端に 1~4 本の刺子突起をつけ, その菌糸はよくよく分岐する分岐菌糸を形成するが, P4421 菌体にはそのような菌糸は観察されず, スリム菌糸の先端は平頭状である.

培養的三次上の差異

両者の差異を以下に示す.

培 地	<i>S. clavuligerus</i>	P4421 菌
シュクロース 培養基	三 育：不具 気中菌糸：形成せず 培 地：白色	三 育：不具～中粒状 気中菌糸：白色 培 地：白色
スターチ大 培 地	気中菌糸：灰色(2%) ～弱いオリ ープ灰色 培 地：無灰色	気中菌糸：白色(5)～灰色 培 地： <i>S. clavuligerus</i> L クローンはヤケ た無灰色
イースト麦芽 培 地	気中菌糸：弱い灰緑 リープ色(1 1/2%) ～弱い橙灰色 (3%) 培 地：灰灰色～弱 い灰色	気中菌糸：白色(5) 培 地：無灰色～弱 い灰色

2. 培養の向化性

培 地	<i>S. clavuligerus</i>	P4421 菌
D-グルコース	-	+
L-イノシトール	(+)	+

上記の通り、イースト麦芽大培地並びにスターチ大培地において、*S. clavuligerus* に菌糸が生育して灰色の気中菌糸を形成する傾向として、P4421 菌株は菌糸発生が良好で白色の気中菌糸を形成する点、並びに D-グルコースの利用性及び気中菌糸形成の形態的特徴に於いて両者の間に著らかな差が認められる。

以上の結果をより、未知菌株中に一致するものが見出せないので P4421 菌株はストレプトミセス属に属する新菌株と認めらるゝことが明白である。

このストレプトミセス属 P4421 菌株は、工業微生物研究所工業微生物研究所に寄せられ、生工研第 2804 番として登録されている。

P4421 菌株より次の菌株を分離したクラパン改三

49

成菌 *S. ketouraba-anque* (特開第 53 - 104774) も、

S. lapira セクシ。シに属すると考えられる菌株であり、イースト麦芽大培地での気中菌糸の色が灰青色で、可溶性色素を生成する点、D-グルコース、L-イノシトールを利用出来ない点、並びにセラチンが陽性である点等から P4421 菌株とは全く別の菌株と考えられる。故に菌株を区別するということは一応よく知られていることであるので、本発明に於いていうストレプトミセス属に属する新株、P4421 菌株はでの自然あるいは人工菌株のすべてを包含する。すなわちクラパン改三を生成し、P4421 菌株と明確に区別しえない菌株すべてを包含する。

本発明の方法に於ける P4421 菌株の培養は通常用いられる各種の微生物培養のための公知の培養方法に於いて行われる。すなわち培養形式は、培養地であるいは、成内気培地が好適であり、培養成分は炭水化物として、ブドウ糖、グリセリン、

シュクロース、可溶性蛋白、ラード油、大豆油、デキストリン、酵母粉；無機塩としては、牛肉エキス、ペプトン、カゼイノ酸、コニン、ステアリン酸、大豆油、脂肪酸、コゼイン、硫酸銅、硫酸カリ等；無機塩としては、りん酸一カリ、りん酸二カリ、硫酸カルシウム、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、塩化ナトリウム、塩化カリウム等が使用され、必要に応じてメチオニン、炭素の無機塩、ビタミン、消泡剤等が添加される。培養は 10-30℃で行われる。培養の経過に於ける培養液中の成分は、コメチナス・ナリグナ (Coccomyces corrigena) b-774 を試験菌としたア、スク・決定法により測定される。通常は 40-75 時間で、上記菌株成分は成菌に達する。

培養液中、三として菌株成分を生成させたクラパン改三は、公知の菌株は、発酵液より分離される。

49

アなわち例えば、塩基又は塩基化反応性基
アなわち、アミン基、フーノール基、水酸基を具
有する多岐官能基ポリマー（商標名 3B-樹脂
（北越化学工業 KK））等による改質と水溶性剤
5 又はメタノール、エタノール、水、アセトン等
による抽出、又は塩イオン交換樹脂例えばメクニ
ックス 1X2（ダウケミカル社製）、多岐官能基ア
ニオン交換樹脂（商標名 PA304（三友化学 KK））、交差結合ア
ニオン交換樹脂（商標名 QASセフ
10 ュアックス A25（ファルマシア社））等による改
質抽出、あるいはグルコース結合アニオン交換樹脂
（商標名セフアックス Q-10（ファルマシア社
））、バイオ・グルコース（バイオラッド社製）等
15 による抽出、あるいは DEAE（ダイエナルアミノ
ニタル）-セルロース、DEAE-交差結合ア
ニオン交換樹脂（商標名セフアックス
（ファルマシア社製））、結晶化セルロース（商標

名 アビデム（北越化学工業 KK））、シリカゲル等
による抽出又は抽出液にこのクロマトグラフ
を用いた抽出液を混合して、抽出液によって抽出
液と交換して用いて抽出することである。

P4421 塩基性イオン交換樹脂中に含有される塩基性
成分 P4421-ファクター-3 は、アミノニトリル 125
mg, 2M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 50 ml, 4M
EDTA(ニナレンジアミン塩) 1 ml よりなる抽出
液で抽出した下地液（ペーパークロマトグラフ
）を用いて R_F 0.250 を与える。P4421-ファク
ター-3 はコマセナス・ナリグナコ-996 塩基性
を示すので、これを用いたビエオートグラフ、
10 により抽出される。P4421-ファクター-3 は
セシテック・クラバラン酸とコ・クロマトグラ
フを行くと、単一の塩基スポットを与える。

上記方法で抽出される P4421-ファクター-3（
ナトリウム塩）は次の組成分析結果を与える。
分析結果収率スペクトル：メタノール中において、

20

220nm 以上で特異的な紫外吸収を示す。

紫外吸収スペクトル：P4421-ファクター-3（
ナトリウム塩）の IR 吸収帯で測定した紫外
吸収スペクトルは水 1 滴の過剰で、下記の
5 特異的な吸収を示す。

約 1790 cm⁻¹（メーラクトン環-CO-）

約 1700 cm⁻¹（-C=O-O-）

この紫外吸収スペクトルはオーセンティックな
クラバラン酸（ナトリウム塩）のそれと完全に
10 一致した。

P4421-ファクター-3（ナトリウム塩）は、水
大腸菌で測定してスタフィロコッカス・アウレ
ウス・ラッセル株（*Staphylococcus aureus* Russell
15 株）に対して約 31 µg/ml の最小阻止濃度（MIC）を有
する。

これらの性質は、オーセンティックなクラバ
ラン酸（ナトリウム塩）の性質と完全に一致し、
塩基性 P4421-ファクター-3 がクラバラン酸である

ることが確認された。

次に本発明の実施例を示すが、本発明の本質に
改題の所定は P4421 塩基性成分の抽出、
その抽出液中にクラバラン酸を添加する方法を
採用するものであり、次の実施例は本発明の例
示であり、実施例に於ける方法にのみ限定される
ものではない。以下に特記した通り 9/40 を示す。

実施例 1

ISP-2 斜面培養法で 24 時間培養した放線菌
Streptomyces sp. P4421 株の一日生培養液を下記
は培養液 32-1、30 ml を入れた 250 ml 三角
フラスコ中に接種し、28℃において、ロータリ
ーシェーカーで 48 時間培養した。

32-1 培養液

平均ニキス (Difco 社製)	4.5 g
トリプトン	0.5
グルコース	4.1

21

22

この用紙を、下記三層紙に 100 cc を入れた容器
 中の 500 cc の水と 30 ml フラスコ 40 ml に、各 1 ml の
 液を 28°C に保ち、ロータリー・エーカーで
 48 時間振盪培養した。

アクリル酸	2.0%
グリセリン	0.5
炭酸水素ナトリウム	1.0
コーンスタール、アフリカ	0.1
$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.01

この溶液を熱め、逐次分液により固体を分離し、
上液と結合した。これを又アセトンで抽出し、

2

アセト = トン	120 ml
0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)	50 ml
0.1M EDTA (pH 7.5)	1 ml

倍率曲分(フラグシ、シズ18~23)を求め、
 試水にてpHを2.5に合し、希釈のローブチノール
 を加し、加色を行った。上層のローブチノール
 層を除去し、1/3量の0.01Mリンド酸溶液(pH

20) を加え、攪拌を行った。抽出中 pH をしらべ
NaOH 水で 20 ml 調整した。水層を除去し有機相は
用メタノールで再抽出し、メタノールを蒸発させ、
残渣を真空乾燥機で乾燥させた。

2.

塩化イオン交換樹脂、マイティオン 2A 3361 (三友
 化成工業) 200 ㄖを充填したコラム (C₁₈-2)
 に通し、塩基成分を洗脱させる。コラムを 400 ㄖ
 の蒸留水で洗浄した後、0.1M の塩酸のメタノ
 ール溶液をつけたメタノールで溶出する。20 ㄖのフラク
 ションを採取した。この塩基成分 (塩基は、CO₂-
 300000 50513000 3-196 を決定基とするパイロア
 セイキによって行った) を決め、(フラクシ、シ
 ン 10 ~ 29) アミン基、フェノール基を改
 変に有する多環芳香族ポリマー 48-樹脂 (三
 友化成工業) 100 ㄖを充填したコラムに通し洗
 脱させる。100 ㄖの蒸留水でコラムを洗浄した後
 0.1M の塩酸のメタノール溶液をつけたアセトン
 溶液で行う。10 ㄖのフラクシ、シンを採取する。
 各フラクシ、シンを下記と同様に下層紙ペー
 ーグラフでクロマトグラフを行い、R_F=0.30 を示す塩
 基成分と塩基成分 (フラクシ、シン 5 ~ 12) を決
 めた。

24

2. 進行を行い、血清水にて溶解した。血清部分を決め、
 凍結乾燥を行った。この凍結を少量の氷イオン水
 に溶解し、200 ml のクロマト用セルロース粉(Whatman
 CC 31)を充填したカラムに差し込むことで、これを
 セロブリアノール：ニタノール：水(4:1:5)
 の上層の溶媒で溶解し、血清部分を決め、ローブ
 リーエバポレーターで凍結乾燥した。これを少量
 の血清水にて溶解し、凍結乾燥し、クナバラン酸
 ナトリウム塩10 mgを得た。

第1図はストレプトミセス・ニムビー 26421 菌の培養液から得られたクラパランニアトリウム塩のX線回折図で決定した、結晶構造式をベクトルを示す。

神戶商會 三號オーシ。シ依天台七
 代 二 人 矢 野 五
 (はかゝる)

